

# 活性型RasV12 による形質転換における転写因子 Bach1の機能解析

著者	中目 亜矢子
号	80
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第2853号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/62411">http://hdl.handle.net/10097/62411</a>

氏 名 なかのめ あやこ 中目 亜矢子

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学位授与年月日 平成 23 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻

学 位 論 文 題 目 活性型 Ras<sup>V12</sup> による形質転換における

転写因子 Bach1 の機能解析

論文審査委員 主査 教授 小林 俊光 教授 五十嵐 和彦  
教授 石井 直人 教授 張替 秀郎

## 論 文 内 容 要 旨

細胞老化は、アポトーシスや細胞周期停止と同様に、がん抑制因子 p53 によるがん抑制の重要な機構である。細胞老化は酸化ストレスによっても引き起こされ、転写因子 Bach1 が酸化ストレスによる細胞老化を抑制することがこれまでに明らかにされてきた。Bach1 は、HDAC-1 (histone deacetylase-1) や N-coR (nuclear co-repressor) とともに、p53 と複合体を形成し、p53 標的遺伝子領域のヒストンを脱アセチル化することで、その転写を抑制している。従って、Bach1 はがん抑制因子 p53 の働きを抑えることによってがん化を促進させる可能性がある。そこで本研究では、*Bach1* 欠損型 (*Bach1*<sup>-/-</sup>) マウスおよびそのマウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryo fibroblast; MEF) を用いて Bach1 のがん化における役割の検討を行った。

まず始めに、形質転換や腫瘍形成に至る重要なステップの一つである不死化のタイミングを比較するため、野生型および *Bach1* 欠損 MEF を用いて 3T3 法による培養を行った。*Bach1* 欠損細胞は、野生型よりも早期に p53 依存性に老化するが、老化を突破しての不死化は、同様のタイミングで起こった。*Bach1* 欠損 MEF は、野生型よりも早期に老化することを考えると、*Bach1* 欠損 MEF はより長期間老化を維持していることが分かった。また、不死化の際に不活化されるがん抑制因子 p53 や p19<sup>Arf</sup> の発現は、野生型と *Bach1* 欠損細胞で明らかな違いを認めなかった。続いて、不死化 MEF に活性型 Ras (*H-Ras*<sup>V12</sup>) を強制発現させて、*in vitro* での形質転換実験を行った。培養皿上での接触増殖阻止実験において、*H-Ras*<sup>V12</sup> 導入 *Bach1* 欠損不死化 MEF では *H-Ras*<sup>V12</sup> 導入野生型不死化 MEF と比較してコロニーの形成が抑制された。また、*H-Ras*<sup>V12</sup> を発現させた不死化 MEF をヌードマウス皮下にマトリジェルと共に移植したところ、*Bach1* 欠損細胞では野生型と比較して腫瘍形成も血管新生も抑えられていた。さらに *H-Ras*<sup>V12</sup> で形質転換した野生型細胞を用いて Bach1 をノックダウンすると、細胞増殖は抑制され、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて比較すると細胞増殖シグナル出力の一つである c-Fos プロモーターの活性が抑制された。以上のことから、Bach1 は *H-Ras*<sup>V12</sup> による形質転換および形質転換細胞の増殖に促進的に働くことが示唆された。

*H-Ras*<sup>V12</sup> 導入不死化 MEF を用いた DNA マイクロアレイ解析結果から、Bach1 は複数の脱リン酸化酵

素遺伝子の発現を抑制することが判明した。脱リン酸化酵素によって抑制される細胞内シグナル制御キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase; ERK) 1/2 のリン酸化を免疫染色およびウェスタンブロット法により検出すると、*Bach1* 欠損細胞で抑制されていた。また、ヒストン H2AX のリン酸化も *Bach1* 欠損細胞で抑制されていることが免疫染色により示された。ERK1/2 リン酸化状態の差異は、脱リン酸化阻害剤投与および Ras から ERK へシグナルを伝達する Raf の活性化によって消失した。これらの結果は、*Bach1* が複数の脱リン酸化酵素群を抑制的に制御し、活性型 Ras 応答性の Ras/Raf 経路のシグナル伝達に関与することで分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ (mitogen activated protein kinase; MAPK) を活性化し、がん化および細胞増殖を促していることを示唆した。また、*Bach1* は抗酸化作用を示すヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) を抑制する。MEF を用いた活性酸素種 (ROS) レベルの測定により、*Bach1* 欠損型では ROS レベルが低く抑えられることが示された。*Bach1* は HO-1 の抑制により ROS レベルの上昇に寄与し、ROS による形質転換を促進している可能性が示唆された。化学発がん物質である 4-ニトロキノリンオキサイド (4-NQO) を 100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で自由飲水にて 16 週間投与し、さらに 8 週間観察した後に形成した舌および食道腫瘍を比較すると、*Bach1* 欠損マウスは野生型と比べて腫瘍形成の頻度が抑制されることを *in vivo* でも認めた。

以上の結果より、*Bach1* は活性型 Ras 応答性発がんに促進的に作用することが示唆された。この活性型 Ras の *Bach1* に対する依存は、非がん遺伝子依存性の一つと考えることができる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題名 ..... 活性型  $Ras^{V12}$  による形質転換における転写因子  $Bach1$  の機能解析 .....

所属専攻・分野名 ..... 医科学 専攻・耳鼻咽喉・頭頸部外科 分野 .....

学籍番号 ..... 氏名 ..... 中目 亜矢子 .....

細胞老化は、アポトーシスや細胞周期停止と同様に、がん抑制因子 p53 によるがん抑制の重要な機構である。細胞老化は酸化ストレスによっても引き起こされ、転写因子  $Bach1$  が酸化ストレスによる細胞老化を抑制することがこれまでに明らかにされてきた。 $Bach1$  は、HDAC-1 (histone deacetylase-1) や N-coR (nuclear co-repressor) とともに、p53 と複合体を形成し、p53 標的遺伝子領域のヒストンを脱アセチル化することで、その転写を抑制している。従って、 $Bach1$  はがん抑制因子 p53 の働きを抑えることによってがん化を促進させる可能性がある。そこで、本研究では、 $Bach1$  欠損型 ( $Bach1^{-/-}$ ) マウスおよびそのマウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryo fibroblast; MEF) を用いて  $Bach1$  のがん化における役割の検討を行った。

$Bach1$  欠損細胞は、野生型よりも早期に p53 依存性に老化するが、老化を突破しての不死化は、同様のタイミングで起こった。 $H-Ras^{V12}$  で形質転換した野生型細胞を用いて  $Bach1$  をノックダウンすると、細胞増殖は抑制され、ルシフェラーゼレポーターアッセイにて比較すると細胞増殖シグナル出力の一つである c-Fos プロモーターの活性が抑制された。以上のことから、 $Bach1$  は  $H-Ras^{V12}$  による形質転換および形質転換細胞の増殖に促進的に働くことが示唆された。

$H-Ras^{V12}$  導入不死化 MEF を用いた DNA マイクロアレイ解析結果から、 $Bach1$  は複数の脱リン酸化酵素遺伝子の発現を抑制することが判明した。 $Bach1$  が複数の脱リン酸化酵素群を抑制的に制御し、活性型 Ras 応答性の Ras/Raf 経路のシグナル伝達に関与することで分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ (mitogen activated protein kinase; MAPK) を活性化し、がん化および細胞増殖を促していることが示唆された。MEF を用いた活性酸素種 (ROS) レベルの測定により、 $Bach1$  欠損型では ROS レベルが低く抑えられることが示された。 $Bach1$  は HO-1 の抑制により ROS レベルの上昇に寄与し、ROS による形質転換を促進している可能性が示唆された。

化学発がん物質である 4-ニトロキノリルオキサイド (4-NQO) を 100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で自由飲水にて 16 週間投与し、さらに 8 週間観察した後に形成した舌および食道腫瘍を比較すると、 $Bach1$  欠損マウスは野生型と比べて腫瘍形成の頻度が抑制されることを *in vivo* でも認めた。

以上の結果より、 $Bach1$  は活性型 Ras 応答性発がんに促進的に作用することが示唆された。

本研究結果は転写因子  $Bach1$  のがん化への関与に関する重要な研究成果と認められる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。